

**METABOLISME DU CALCIUM
ET LIBERATION DE L'ACETYLCHOLINE DANS
L'ORGANE ELECTRIQUE DE LA TORPILLE**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Eliane BABEL-GUERIN

de

Genève

Thèse N° 10

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

**METABOLISME DU CALCIUM
ET LIBERATION DE L'ACETYLCHOLINE DANS
L'ORGANE ELECTRIQUE DE LA TORPILLE**

T H E S E

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Eliane BABEL-GUERIN

de

Genève

Thèse N° 10

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Ralph Straub et du docteur Yves Dunant, professeur assistant, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 5 juillet 1974

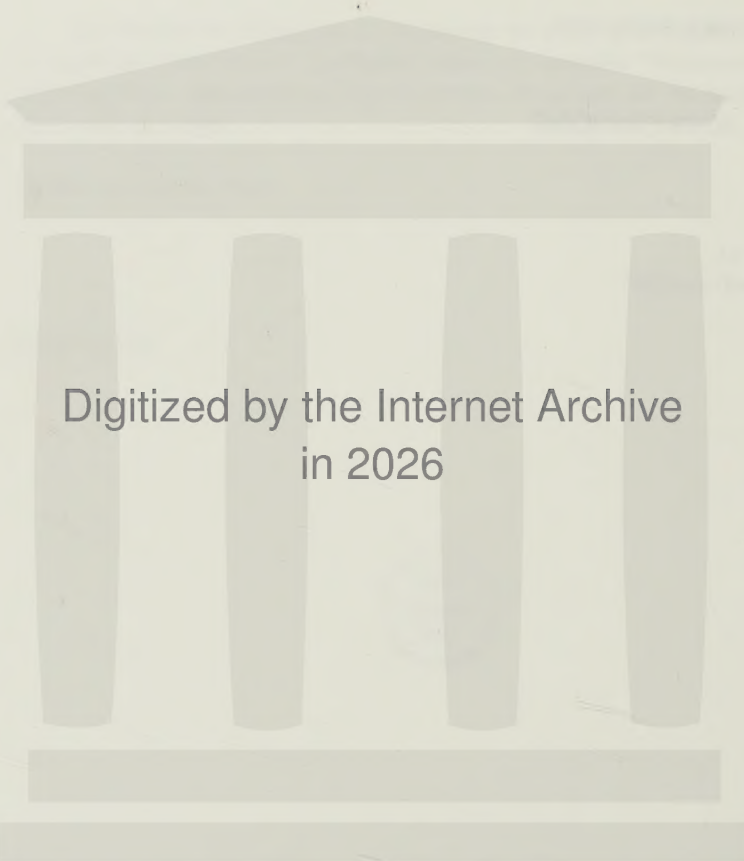
Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 10



A MES PARENTS

A JEAN-FRANCOIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

METABOLISME DU CALCIUM ET LIBERATION DE L'ACETYLCHOLINE DANS L'ORGANE ELECTRIQUE DE LA TORPILLE

CALCIUM METABOLISM AND ACETYLCHOLINE RELEASE IN THE ELECTRIC ORGAN OF *TORPEDO MARMORATA*

ELIANE BABEL-GUÉRIN

Département de Pharmacologie, Ecole de Médecine 20, 1211 Genève 4, Suisse

(Received 25 February 1974. Accepted 4 March 1974)

Résumé—Le métabolisme du calcium a été étudié dans l'organe électrique de la Torpille, au repos et en activité, *in vivo* et *in vitro*, en mesurant le calcium total et en utilisant du ^{45}Ca . Lorsque le tissu est mis en présence de fortes concentrations de calcium, un échange complet s'effectue entre le calcium cellulaire et celui du milieu d'incubation. En présence de faibles concentrations, le tissu retient son calcium qui, dans ce cas, s'échange mal avec l'extérieur. La stimulation cause une augmentation nette du calcium cellulaire et accélère son échange avec le milieu extérieur. Cette entrée de calcium concerne principalement les terminaisons nerveuses présynaptiques car on l'observe aussi lorsque la transmission est bloquée par le curare qui agit au niveau des électroplaques. Il semble que le calcium influence la répartition intracellulaire du transmetteur. En effet, l'entrée présynaptique de calcium s'accompagne d'une diminution de l'ACh 'liée' (vésiculaire). Lorsque le tissu est incubé dans une solution exempte de calcium, surtout en présence d'EDTA, la réponse électrophysiologique disparaît; le taux d'ACh 'libre' (disponible) diminue alors, mais son 'turnover' augmente. Le calcium extracellulaire est donc nécessaire au maintien du compartiment d'ACh immédiatement disponible.

Abstract—Calcium metabolism was studied in the electric organ of *Torpedo*, at rest and after electrical stimulation, *in vivo* and *in vitro*, by measuring total calcium and using ^{45}Ca . Seasonal variations in the calcium metabolism were observed, summer animals being richer in the ion than winter ones. When the tissue was incubated in high calcium concentrations, complete exchange was obtained between cellular calcium and that of the external medium. In the presence of low concentrations, the tissue retained its calcium which, in this case, was poorly exchanged. Stimulation was accompanied by a net increase of cellular calcium and by acceleration of its exchange with that of extracellular space. This entry of calcium seems to involve mainly the presynaptic nerve endings, since it is also observed when transmission was blocked by curare which acts at the level of the postsynaptic electroplaques. Calcium may also influence the intracellular repartition of the transmitter. As a matter of fact, the presynaptic entry of calcium is accompanied by diminution of 'bound' ACh (vesicular ACh). When the tissue was incubated in a solution devoid of calcium, especially if EDTA was added, the electrical response disappeared; then 'free' ACh which is the immediately available compartment, decreased but its turnover rose. 'Bound' and 'free' ACh were also measured under various conditions of homogenization and the results discussed. It is concluded that extracellular calcium is required for the maintenance of the immediately available compartment of ACh.

L'INFLUENCE du calcium sur l'excitation des fibres nerveuses est bien connue. On sait que ce ion, dont la concentration intracellulaire est très faible, entre dans les cellules à la faveur du potentiel d'action (HODGKIN & KEYNES, 1957; BAKER *et al.* 1971).

La transmission synaptique aussi exige la présence de calcium ionisé dans l'espace extracellulaire. Elle est

indispensable à la libération des neurotransmetteurs et en particulier de l'acétylcholine (ACh) (HARVEY & MACINTOSH, 1940). L'hypothèse généralement admise est que le calcium pénètre dans les terminaisons au cours de la dépolarisation et y déclenche les mécanismes responsables de la libération de l'ACh (KATZ, 1969). On sait également que dans le ganglion

sympathique, la stimulation du nerf préganglionnaire augmente l'entrée de ^{45}Ca (BLAUSTEIN, 1971). Néanmoins, cette observation ne permet pas de connaître s'il y a un gain net de calcium intracellulaire ou seulement échange accru entre l'isotope radioactif et le calcium endogène.

D'autre part, la question se pose de savoir si les mouvements de calcium influencent le métabolisme du transmetteur dans les terminaisons nerveuses. L'organe électrique de la Torpille, grâce à son homogénéité, représente une préparation particulièrement favorable pour cette étude. La transmission y est purement cholinergique et les terminaisons extrêmement nombreuses. On a pu établir que l'ACH y était stockée en deux compartiments: l'ACH 'liée' qui n'est pas détruite lorsqu'on homogénéise le tissu et qui est principalement associée aux vésicules synaptiques, et l'ACH 'libre' qui, elle, est hydrolysée pendant l'homogénéisation (ISRAËL *et al.*, 1968, 1970; MARCHBANKS & ISRAËL, 1971). La localisation subcellulaire de cette dernière n'a pas encore été précisée, mais elle représente le compartiment immédiatement disponible (DUNANT *et al.*, 1971, 1972, 1974).

Ce travail a été entrepris afin de déterminer le métabolisme du calcium dans l'organe électrique au repos et en activité, et d'établir ses relations avec celui de l'ACH. Des données partielles ont déjà fait l'objet de publications préliminaires (BABEL-GUÉRIN & DUNANT, 1972a, b).

MATERIELS ET METHODES

Prélèvement du tissu

Les Torpilles (*Torpedo marmorata*) proviennent de la Station de Biologie Marine d'Arcachon. Ce sont en général des femelles de 30 à 50 cm de long. Elles sont anesthésiées à la tricaine (MS 222, Sandoz) à raison de 1 g pour 3 l. d'eau de mer. Des tranches fines de 3–5 mm de tissu électrogène sont prélevées sur toute la largeur de l'organe électrique. Ces morceaux sont, soit utilisés immédiatement, soit conservés à 4°C dans une solution physiologique contenant 208 mM-NaCl; 5,6 mM-KCl; 4,4 mM- CaCl_2 ; 1,2 mM- MgCl_2 ; 7 mM- NaHCO_3 ; 1,2 mM- NaH_2PO_4 ; 5,5 mM-glucose; 200 mM-saccharose; 400 mM-urée. Ce milieu est équilibré par un mélange gazeux d' O_2 à 95% et de CO_2 à 5%. Le pH est maintenu à environ 7,2.

Incubation

Les fragments d'organe sont, soit superfusés par un goutte à goutte (1 à 5 ml/min), soit complètement immergés dans la solution physiologique décrite plus haut. Pour certaines expériences, le tissu est incubé dans des concentrations de calcium de 0 à 8,8 mM. Le calcium radioactif (^{45}Ca , Würenlingen, activité spécifique: 29,3 mCi/mg), est ajouté à la solution physiologique à raison de 1 $\mu\text{Ci/ml}$. On doit toujours tenir compte dans les incubations des longs temps de diffusion imposés par la géométrie particulière de ce tissu

(AUGER & FESSARD, 1941; DUNANT *et al.* 1972). Il faut par exemple, pour un fragment de 2 mm d'épaisseur, attendre 1 h avant que les concentrations de CaCl_2 s'équilibrent. Pour les substances à plus haut poids moléculaire (curare, EDTA), il est évident que la durée d'incubation doit être encore augmentée.

Méthodes électrophysiologiques

Les fragments de tissu électrogène peuvent être stimulés de deux manières différentes (DUNANT *et al.*, 1972). En 'champ électrique': le tissu est alors entièrement soumis au courant de stimulation. Les fragments sont suspendus par deux électrodes de stimulation en platine qui les traversent dans le sens des prismes. Deux électrodes d'enregistrement en argent sont disposées sur les faces ventrale et dorsale du fragment. Par le nerf: un fragment d'organe électrique et le tronc nerveux dont il dépend sont disséqués ensemble. Les électrodes de stimulation sont mises en contact avec le nerf, celles d'enregistrement avec les deux faces du fragment. La stimulation se fait alors indirectement.

Expériences in vivo

La Torpille est anesthésiée à la tricaine (1/3000). On dissèque soigneusement un ou deux des quatre nerfs électriques sur lesquels on place les électrodes de stimulation. Le territoire d'où l'on excisera les échantillons est préalablement délimité en enregistrant quelques réponses. Pour comparer les résultats obtenus *in vivo* avec ceux des tissus incubés, du sang est prélevé au niveau de l'aorte afin d'analyser les électrolytes plasmatiques.

Dans une expérience, nous avons injecté dans l'aorte d'une Torpille d'environ 600 g, 500 μCi de ^{45}Ca 36 h avant la stimulation.

Détermination du calcium

Le calcium a été déterminé sur des échantillons de tissu non lavés, ce qui fournit la mesure du calcium total (extracellulaire et cellulaire). Pour le dosage du calcium cellulaire, un lavage d'1,5–3 h est nécessaire.

Photométrie de flamme. 200–500 mg de tissu électrogène sont calcinés à 900°C pendant environ 10 h. Le résidu de cette calcination est repris, soit dans 5 ml 1N-HCl pour les mesures par émission ($\lambda = 620 \text{ nm}$), soit dans 1 ml 1N-HCl + 1% LaCl_3 pour les mesures en absorption atomique ($\lambda = 422,7 \text{ nm}$). Le photomètre est un 'Zeiss' M4QIII. La flamme est alimentée par un mélange d'air et d'acétylène.

Titrimétrie. La teneur en calcium du tissu a aussi été déterminée par titration. Pour cela, environ 1 g de tissu est plongé dans 2,5 ml d'eau bidistillée bouillante, homogénéisé et centrifugé à 3000 rev/min pendant 10 min et 0,2 ml de sur-nageant sont pris et titrés par de l'EDTA $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ('Complexon III', Siegfried, Zofingen, Suisse), en présence du mélange NaOH 1,5 N + KCN 0,05%. L'indicateur est le 'HHSNN' (Siegfried).

Les résultats obtenus par ces différentes méthodes ne sont pas significativement différents.

Détermination du ^{45}Ca . La détermination du ^{45}Ca se fait sur des échantillons lavés et non lavés. Environ 200 mg de tissu sont dissous dans 1 ml de 1N-NaOH à 40°C pendant

12 h. Après neutralisation par 1N-HCl, 10 ml de scintillateur Bray (BRAY, 1960) sont ajoutés et la quantité de ^{45}Ca est déterminée par un compteur à scintillation 'Tricarb Packard'. L'efficacité du comptage est déterminée par l'emploi de standards et les valeurs corrigées en conséquence.

Extraction et dosage de l'ACh

Pour la mesure de l'ACh totale, un fragment de tissu est plongé dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 5% à 0°C. Après 1,5 h, il est broyé puis le TCA est extrait par cinq lavages à l'éther diéthylique qui est lui-même éliminé par évaporation. L'ACh est dosée en utilisant le muscle rectus de grenouille (MACINTOSH, 1950).

L'ACh 'liée' est obtenue en homogénéisant un échantillon dans la solution physiologique 1 à 5 min avant le traitement au TCA. Dans quelques expériences, le milieu d'homogénéisation a été différent de celui d'incubation. L'ACh 'libre' représente la différence entre l'ACh totale et l'ACh 'liée'.

RESULTATS

Teneur et échanges du calcium dans le tissu électrogène

Le tissu électrogène fraîchement prélevé et non lavé contient $2,4 \pm 0,417 \mu\text{mol}$ de calcium par gramme (poids humide, moyenne $\pm \text{ts}/\sqrt{n}$). Le taux plasmatique du calcium a été mesuré chez sept Torpilles. Il est de $3,43 \pm 0,272 \mu\text{mol/ml}$. La plupart de ces valeurs ont été obtenues en hiver. Les quelques mesures faites en été suggèrent qu'il se produit des variations saisonnières et que les Torpilles d'été sont plus riches en calcium.

Nous avons d'autre part mesuré la quantité de calcium du tissu électrogène après avoir incubé quelques fragments d'organe électrique dans le milieu physiologique, où la concentration de calcium était portée de 0 à 8,8 mM. La solution contenait aussi $1 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{45}Ca pour mesurer les échanges entre le milieu et le tissu. Les résultats sont représentés sur la Fig. 1.

La courbe A exprime le taux de calcium total mesuré par photométrie ou titrimétrie en fonction de la concentration de calcium régnant dans le milieu d'incubation. Dans une solution dépourvue de calcium, le tissu électrogène retient encore le 50 pour cent de son calcium. Lorsque la concentration dans le milieu d'incubation augmente, le taux de calcium total augmente suivant une relation non linéaire. On note aussi que le taux de calcium mesuré à l'excision et exprimé en fonction du taux plasmatique s'inscrit dans la courbe obtenue *in vitro*.

La courbe B représente le calcium ayant quitté le milieu d'incubation et pénétré dans le tissu. Elle est calculée à partir du ^{45}Ca trouvé dans le tissu non lavé sur la base de la radioactivité spécifique (RAS) du milieu d'incubation. Par exemple, les 1539 d.p.m. mesurés dans un gramme de tissu incubé dans une solution dont la RAS est de 1009 d.p.m./nmol représentent 1,5

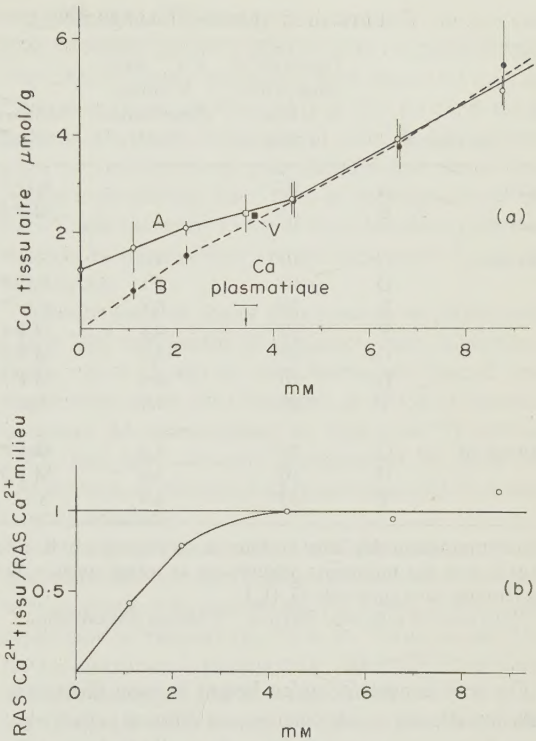


FIG. 1. (a) Calcium du tissu électrogène en fonction de la concentration plasmatique et de celle du milieu d'incubation. Courbe A: ^{40}Ca du tissu non lavé déterminé au photomètre de flamme ou par titrimétrie, le point $\square$ exprime le taux du tissu fraîchement excisé en fonction de la concentration plasmatique. Courbe B: Ca^{2+} du milieu d'incubation ayant pénétré dans le tissu. Il est exprimé en $\mu\text{mol/g}$ à partir de la RAS du milieu (cf texte). $\blacksquare$: Même mesure obtenue à partir de la Torpille radioactive. Les points expriment la valeur moyenne $m \pm \text{ts}/\sqrt{n}$. (b). RAS tissu/RAS milieu d'incubation exprimée en fonction de la concentration de calcium dans le milieu d'incubation. Les valeurs sont tirées de la Fig. 1a. A partir de 4,4 mm de calcium, les RAS sont égales, ce qui suppose un échange complet de Ca^{2+} entre le tissu et le milieu d'incubation.

μmol de calcium provenant du milieu d'incubation. Le point V se rapporte à la Torpille ayant reçu 500 μCi de ^{45}Ca avant l'expérience, dont 1 ml de plasma contient 3,6 μmol et 2004050 d.p.m. (RAS = 556 d.p.m./nmol). Cette valeur obtenue *in vivo* s'inscrit aussi dans la relation trouvée *in vitro*.

On remarque que les courbes A et B sont significativement distinctes lors d'incubation dans les solutions à basses concentrations de calcium. A partir d'une concentration proche du taux physiologique, elles se rejoignent pour ne former qu'une seule droite. La RAS du tissu est alors égale à celle du milieu d'incubation (Fig. 1b).

TABLEAU 1. ENTRÉE DE ⁴⁰Ca ET DE ⁴⁵Ca PENDANT LA STIMULATION DE L'ORGANE ÉLECTRIQUE

Expériences		Durée de la stimulation à 10/s (min)	Ca ²⁺ dans le milieu d'incubation (mM)	Milieu de lavage	Ca ²⁺ (mM)	⁴⁰ Ca cellulaire (μmol/g)		⁴⁵ Ca cellulaire (d.p.m./g × 10 ⁻³)	
						Témoin	Stimulé	Témoin	Stimulé
<i>In vivo</i>	A	10'	—	S.U.*	0	0,40	0,70	—	—
	B	5'	—	M.P.†	0	2,58	2,80	619	1149
<i>In vitro</i>	C	10'	4,4	S.U.*	0	0,67	1,14	290	508
	D	10'	1,1	S.U.*	0	0,86	0,91	—	—
	E	10'	8,8	S.U.*	0	0,95	1,91	—	—
	F	10'	4,4	M.P.†	4,4	—	—	171	399
	G'	10'	4,4	M.P.†	4,4	—	—	238	408
	H'	10'	4,4	M.P.†	0	—	—	295	432
	I'	10'	4,4	S.U.*	0	1,20	1,35	—	—
Curare 10 ⁻³ M	G	10'	4,4	M.P.†	4,4	—	—	258	404
	H	10'	4,4	M.P.†	0	—	—	258	430
	I	10'	4,4	S.U.*	0	1,11	1,55	—	—

A: Stimulation des 2ème et 3ème nerfs électriques. B: Stimulation du 2ème nerf électrique. C: Stimulation par le nerf. D et E sont des fragments prélevés sur la même torpille. D.E.F.G.H.I.: Stimulation en 'champ électrique'. G', H', I', sont les témoins sans curare de G, H, I.
* Sucrose 500 mM, urée 500 mM. † Milieu physiologique.

On peut considérer qu'en lavant le tissu dans une solution dépourvue de calcium, on élimine principalement le calcium extracellulaire et que l'on conserve le calcium cellulaire. Sur la base de cette estimation, le milieu extracellulaire d'un gramme de tissu contiendrait *in vivo* 1,2 μmol de calcium, les 1,2 restant étant associés aux cellules.

Effet de la stimulation sur le calcium intracellulaire

Nous avons stimulé le tissu électrogène en 'champ électrique' et par les nerfs, *in vivo* et *in vitro*. Des fragments ont ensuite été lavés et leur taux de calcium comparé à celui des témoins non stimulés. Il s'agissait, le plus souvent d'une stimulation répétitive supramaximale de 10/s pendant 10 min. L'ensemble des résultats figure au Tableau 1.

La stimulation augmente le calcium intracellulaire de l'organe électrique. En effet, les fragments stimulés contiennent 40-70 pour cent de calcium de plus que les témoins. On observe aussi une entrée de ⁴⁵Ca quantitativement semblable après avoir stimulé le tissu en présence de calcium radioactif. Dans ce cas, la solution de lavage non radioactive pouvait contenir ou non du ⁴⁰Ca. L'entrée de calcium dépend aussi de la concentration régnant dans le milieu d'incubation au moment de la stimulation. Pour une concentration de 1,1 mM, l'augmentation est d'environ 10 pour cent, tandis que pour 8,8, elle dépasse toujours 60 pour cent. Ceci suggère que pendant la stimulation les cellules ont accumulé du calcium provenant du milieu extérieur. Il faut noter que les valeurs obtenues après lavage par le

sucrose-urée n'ont pas été constamment reproductibles.

Nous avons répété ces expériences en présence de d-tubocurarine 1 mM. On sait que, dans l'organe électrique de la Torpille, le curare bloque la transmission synaptique (Fig. 3a) (AUGER & FESSARD, 1941). Par contre il n'empêche pas la libération de l'ACh (DUNANT, résultats non publiés). Son action est donc uniquement post-synaptique. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de l'entrée de calcium se fait aussi bien en présence qu'en absence de curare. Ceci indique que l'accumulation du calcium due à la stimulation est localisée au niveau présynaptique, probablement dans les terminaisons nerveuses.

Entrée de calcium et libération d'ACh

Dans le tissu électrogène, le transmetteur est réparti en deux compartiments, l'ACh 'liée', qui est associée aux vésicules, et l'ACh 'libre', qui est hydrolysée pendant l'homogénéisation. A l'excision, le taux d'ACh 'liée' est égal à celui de l'ACh 'libre' (respectivement 325 ± 55 et 345 ± 40 nmol/g). Au cours de l'incubation dans la solution physiologique, l'ACh 'liée' a tendance à augmenter aux dépens de la 'libre' (respectivement 437 ± 42 et 293 ± 21 nmol/g). Lors d'une stimulation répétitive à 10/s, la réponse électrophysiologique est généralement épuisée au bout de 3 min. On observe alors une chute d'ACh 'libre' qui représente le compartiment immédiatement disponible (DUNANT *et al.*, 1972). Lorsque la stimulation continue au-delà de

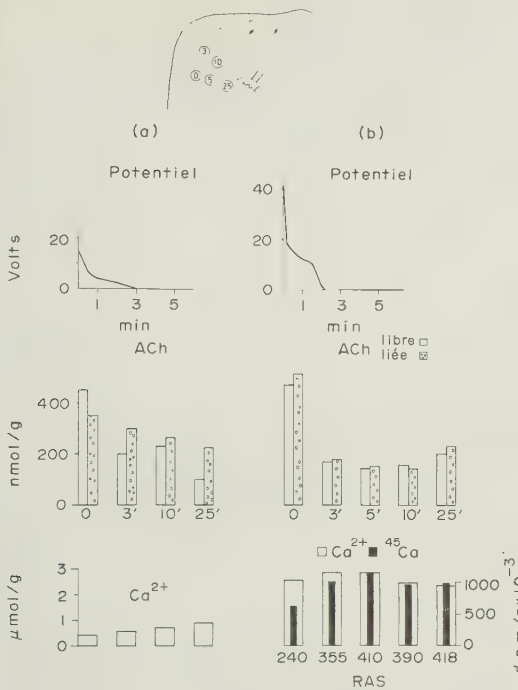


FIG. 2. Calcium et ACh du tissu stimulé *in vivo*. Les Torpilles sont anesthésiées à la tricaine, et le tissu stimulé à 10/s après dissection soignée d'un ou deux nerfs électriques. (a) Torpille d'hiver (février 1972). Décharge de 11 v, épuisée en 3 min. Après l'épuisement de la transmission, diminution graduelle de l'ACh 'liée' et augmentation progressive du calcium cellulaire. (b) Torpille d'été (juin 1973) ayant reçu 36 h auparavant 500 μ Ci de ^{45}Ca . Décharge de 41 v épuisée en 2 min 15 s. Chute brutale des compartiments d'ACh dès la troisième minute. Gain net de calcium cellulaire, puis échange complet avec le milieu extracellulaire.

l'épuisement de la décharge, l'ACh 'liée' peut aussi diminuer.

Nous avons mesuré parallèlement l'entrée de calcium et les variations d'ACh dans deux expériences *in vivo* (Fig. 2). La première a été faite sur une Torpille d'hiver dont le taux de calcium était particulièrement bas. Nous l'avons stimulée continuellement à la fréquence de 10/s pendant 25 min et prélevé des échantillons à la 3ème, 10ème et 25ème minute (Fig. 2a). Au bout de 3 min, la réponse, initialement de 17 v, est épuisée. A ce stade, le taux d'ACh 'libre' baisse considérablement; puis il se maintient approximativement au même niveau après 25 min. Quant à l'ACh 'liée', elle décroît graduellement au cours de la stimulation, tandis que le calcium cellulaire augmente progressivement. L'entrée de calcium la plus importante se fait au début de la stimulation. En effet, elle est de 83 pmol/g/influx pendant les 3 premières min pour ne plus être que de 19 pmol/g/influx à la 25ème min.

La deuxième expérience a été faite en été sur une petite Torpille de 600 g dont le taux de calcium était élevé. Nous avions, 36 h auparavant, injecté 0,5 mCi de ^{45}Ca dans l'aorte de l'animal (Fig. 2b). La chute de la réponse électrophysiologique et celle de l'ACh sont dans ce cas beaucoup plus rapides que dans l'expérience précédente. En 2 min, la décharge tombe de 41 2V; elle disparaît 15 s plus tard. Les deux compartiments du transmetteur chutent déjà après 3 min de stimulation.

Ensuite seuls de légers changements se produisent, l'ACh 'liée' continuant de diminuer, mais faiblement. Enfin, après 25 min de stimulation, on observe une augmentation des deux fractions de l'ACh et particulièrement du compartiment lié. Quant au ^{40}Ca et au ^{45}Ca , leur taux s'accroît brusquement au stade où l'ACh chute, et diminue à 25 min, lorsque l'ACh a tendance à remonter.

Cette expérience se prête à une description précise des mouvements et des échanges de calcium se produisant au cours de la stimulation. Au repos, la RAS, qui représente le rapport du ^{45}Ca au ^{40}Ca , est de 556 d.p.m./nmol dans le plasma et de 390 d.p.m./nmol dans le tissu électrogène non lavé. La RAS du calcium cellulaire, mesurée après lavage, est encore plus basse (240 d.p.m./nmol). Trente-six h après l'injection de ^{45}Ca , les cellules de l'organe électrique n'ont pas encore totalement échangé leur calcium avec celui, plus radioactif, de l'espace extracellulaire. La stimulation fait tout d'abord entrer du calcium dans les cellules: le taux augmente et la RAS s'accroît sans toutefois atteindre après 3 min, celle du tissu non lavé. On assiste ensuite à un échange complet, le taux de calcium cellulaire n'augmentant plus mais sa RAS égalant celle du tissu non lavé.

Ces deux expériences, faites sur des Torpilles d'hiver ou d'été et dont le tissu a été prélevé à des stades différents de l'activité électrique, donnent des résultats concordants. Ils permettent d'établir une relation inverse entre le taux de calcium intracellulaire et l'ACh 'liée'. D'autres résultats obtenus à partir d'expériences *in vitro*, moins démonstratives confirment cette relation.

Incubation et homogénéisation du tissu en absence de calcium

Lorsque l'on incube le tissu électrogène en absence de calcium, la réponse électrophysiologique décroît puis disparaît. La vitesse de cette disparition dépend de la composition du milieu de lavage. Elle est plus rapide si l'on ajoute de l'EDTA à la solution sans calcium et peut être encore accélérée en présence de NaCl isotonique. Par contre en présence de sucrose urée, (500 mm-

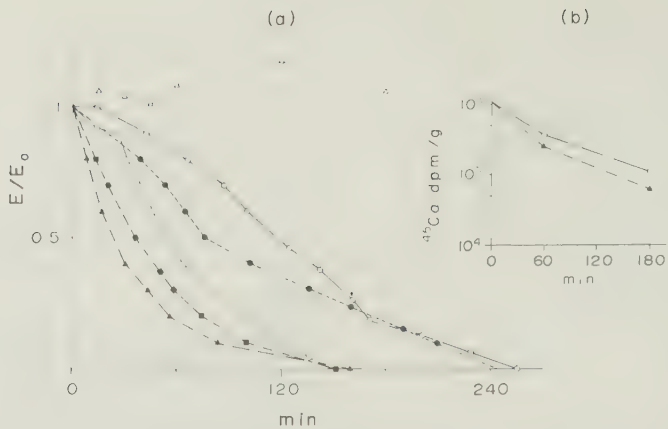


FIG. 3. (a) Amplitude de la réponse électrophysiologique en fonction du temps d'incubation dans différents milieux. ○: sucrose-urée (500 mM-sucrose, 500 mM-urée). ●: solution physiologique sans calcium. ▲: NaCl 500 mM. ■: EDTA 10 mM dans la solution physiologique sans calcium. △: témoin, solution physiologique (4,4 mM calcium). □: solution physiologique + 10^{-3} M-D-tubocurarine. (b) ^{45}Ca tissulaire en fonction du temps d'incubation dans deux milieux dépourvus de calcium. ○: sucrose-urée. ▲: NaCl.

sucrose, 500 mM-urée) elle met plus de temps à disparaître (Fig. 3a).

Par ailleurs, on constate sur la Fig. 3b que le NaCl isotonique est beaucoup plus efficace pour éliminer le ^{45}Ca du tissu électrogène que ne l'est le sucrose-urée. Nous avons aussi dosé l'ACh après 2 ou 3 h de lavage par le sucrose-urée, et n'avons pas obtenu de changements notables de son taux, ni de sa répartition dans les compartiments (ACh 'liée': 317 ± 59 ; ACh 'libre': 243 ± 24 nmol/g). Par contre dans le NaCl, l'ACh 'liée' augmente aux dépens de l'ACh 'libre' (respectivement 427 ± 64 et 234 ± 47 nmol/g).

Si le fragment a été incubé en présence d'EDTA, le compartiment 'libre' disparaît complètement et il est impossible de le reconstituer, même lorsqu'on homogénéise le tissu en présence de calcium. Inversement, lorsque le tissu a été incubé dans le milieu physiologique et ensuite homogénéisé dans l'EDTA, l'équilibre entre les compartiments est déplacé en faveur de l'ACh 'liée'. La Fig. 4 représente une étude systématique de l'influence respective des milieux d'incubation et d'homogénéisation faites sur des Torpilles d'hiver (novembre 1972).

Puisque les milieux d'incubation influencent la

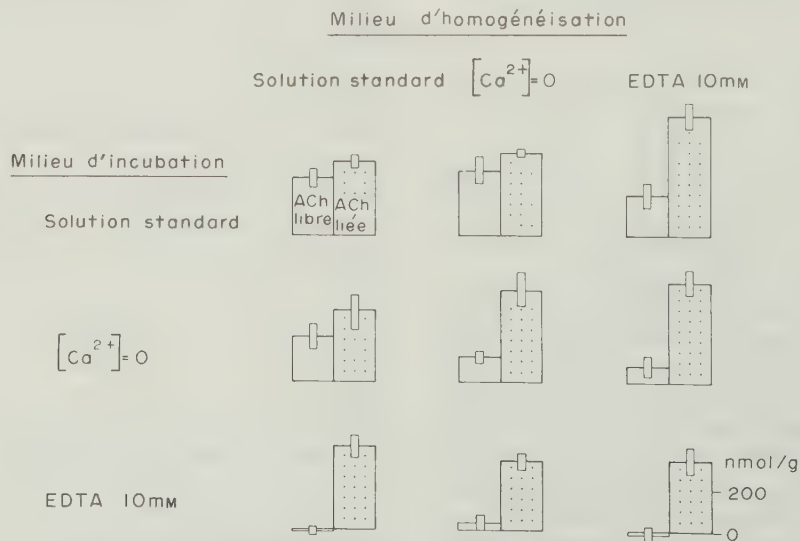


FIG. 4. Influence respective des milieux d'incubation et d'homogénéisation sur les compartiments d'ACh de l'organe électrique.

TABLEAU 2. INCORPORATION DE L'ACÉTATE- ^{14}C DANS L'ACh EN PRÉSENCE ET ABSENCE DE CALCIUM

Milieu	Incubation	Temps	ACh 'liée'			ACh 'libre'		
			(d.p.m./g × 10 ⁻³)	(nmol/g)	RAS	(d.p.m./g × 10 ⁻³)	(nmol/g)	RAS
Torpille d'hiver								
Solution physiologique		3 h	520	542	962	895	476	1881
Solution physiologique sans Ca		3 h	845	889	950	448	99	4521
Torpilles d'été (n = 3)								
Solution physiologique		24 h	1408 ± 67*	580 ± 35	2448	2102 ± 328	571 ± 148	3681
EDTA 10 mM†		24 h	415 ± 77	356 ± 85	1206	721 ± 74	87 ± 30	13188

* Les valeurs représentent la moyenne $m \pm \text{E.S.M. (S.E.M.)}$.

† L'EDTA est ajouté à la solution physiologique dépourvue de calcium.

répartition du calcium dans les différents compartiments, il nous a paru intéressant d'étudier le métabolisme de l'ACh dans ces diverses conditions. Pour cela, nous avons mesuré l'incorporation d'acétate- ^{14}C , dans l'ACh (ISRAËL et TUČEK, 1974) en présence et en absence de calcium.

Dans une expérience faite en hiver (Tableau 2), le taux d'ACh 'libre' diminue au cours des 3 h d'incubation sans calcium. Mais si la quantité d'ACh 'libre' baisse, sa RAS augmente fortement ce qui indique un échange plus rapide avec le précurseur radioactif. Nous avons répété cette expérience avec des Torpilles d'été mais il a fallu incubé les fragments plus longtemps et ajouter de l'EDTA pour observer le même phénomène. Quant à l'ACh 'liée', sa RAS n'augmente pas. Elle tend au contraire à diminuer pour les longues périodes d'incubation.

DISCUSSION

L'incubation du tissu électrogène de la Torpille dans des solutions de différentes concentrations de calcium a permis de mettre en évidence les phénomènes suivants: aux faibles concentrations, le calcium endogène est retenu dans le tissu; il s'échange mal avec celui du bain d'incubation. Cette rétention explique que l'on puisse observer les effets de la stimulation malgré de longs temps de lavage. Au contraire, l'échange paraît être complet entre le tissu et le milieu extérieur lorsque la concentration de calcium y est élevée. Il faut relever (Fig. 1), que le taux et les échanges de calcium mesurés dans l'organe *in vivo*, exprimés en fonction de la concentration plasmatique, s'inscrivent dans la relation obtenue *in vitro*.

Dans l'organe électrique de la Torpille, l'espace extracellulaire mesuré à l'inuline radioactive représente 77 pour cent du volume total (DUNANT & FAIVRE, données non publiées). En admettant que le calcium se distribue dans cet espace à une concentration égale à

celle du milieu d'incubation, la quantité de calcium mesurée dans le tissu reste inférieure à celle que l'on pensait trouver dans le milieu extracellulaire. Ceci suggère, soit que le calcium ne se distribue pas régulièrement dans cet espace, soit que la méthode à l'inuline aboutit à une surestimation.

Dans le ganglion sympathique, BLAUSTEIN (1971) a mis en évidence une entrée présynaptique de ^{45}Ca pendant la stimulation. Nous avons observé le même phénomène dans l'organe électrique de la Torpille stimulé en présence de calcium radioactif. L'accroissement de la quantité de calcium mesuré dans ces conditions nous permet en plus d'affirmer qu'il y a un gain net de calcium, et pas seulement une accélération de l'échange entre l'isotope et le calcium cellulaire. Dans un cas (Fig. 2b), nous avons pu observer en succession l'augmentation du calcium cellulaire, puis son échange complet avec le calcium extracellulaire. Ces résultats, et les observations de la Fig. 1 suggèrent qu'à partir d'un seuil critique, la cellule rejette le calcium entrant, ce qui augmente son 'turn-over' et favorise un échange complet. L'augmentation du ^{40}Ca , comme celle du ^{45}Ca , n'est pas réduite lorsque le tissu est stimulé en présence de d-tubocurarine à une concentration suffisante pour bloquer la transmission synaptique. Il ne semble pas, par ailleurs, que le curare perturbe le fonctionnement des terminaisons nerveuses, car la libération d'ACh est la même dans les fragments curarisés et dans les témoins (données non publiées). Nous proposons l'interprétation suivante: dans l'organe électrique, comme dans le ganglion, l'entrée de calcium concerne principalement des structures présynaptiques, probablement les terminaisons nerveuses.

L'ACh de l'organe électrique est répartie en deux compartiments principaux (ISRAËL *et al.*, 1968, 1970; MARCHBANKS & ISRAËL, 1971). L'ACh 'liée' est celle qui résiste aux cholinestérases lorsqu'on homogénéise le tissu. Elle est en grande partie associée aux vésicules

synaptiques et représente ordinairement la moitié de l'ACh totale. L'ACh 'libre' est le compartiment hydrolysé au cours de l'homogénéisation. Sa localisation subcellulaire n'a pas encore pu être établie mais elle représente le compartiment immédiatement disponible pour la libération. (DUNANT *et al.*, 1974). En absence de calcium l'amplitude de la réponse électrophysiologique décroît, l'ACh 'libre' diminue tandis que l'ACh 'liée' tend à augmenter. L'adjonction d'EDTA provoque une simple disparition du compartiment 'libre'. Le calcium extracellulaire est donc nécessaire au maintien du compartiment disponible. Lorsque le calcium entre dans les terminaisons à la faveur de la stimulation, c'est l'ACh 'liée' qui diminue (Fig. 2). Ainsi le calcium pourrait être un agent régulateur de la répartition de l'ACh dans les compartiments.

Il est surprenant de constater que le métabolisme de l'ACh 'libre' augmente en absence de calcium. La vitesse de synthèse de l'ACh est peut-être régie par le taux d'ACh 'libre' qui est abaissé dans ces conditions. Mais d'autres mécanismes peuvent aussi expliquer ce phénomène.

En détruisant le compartiment disponible, l'homogénéisation équivaut peut-être à une stimulation brutale du tissu. Ce point de vue est confirmé par le fait que, lorsque le milieu d'homogénéisation est une solution physiologique exempte de calcium, seule une partie du compartiment 'libre' est détruite. Le reste demeure dans l'homogénat, peut-être dans des terminaisons nerveuses refermées sur elles-mêmes. Ce type d'expérience, espérons le pourra donner des éclaircissements sur la localisation subcellulaire de l'ACh disponible.

Ce travail montre que le calcium endogène de l'organe électrique de la Torpille ne s'échange avec celui du milieu d'incubation que pour des concentrations élevées de celui-ci. La stimulation, qui provoque une entrée de calcium, favorise cet échange. Une fois dans la terminaison nerveuse, le calcium semble influencer la répartition de l'ACh dans les compartiments.

Remerciements—Je remercie le Dr. Y. DUNANT pour avoir guidé et encouragé cette recherche, Mme. M. MOOSMAYER-MEIER et Melle. L. HIRT pour leur précieuse aide technique, ainsi que le Dr. CAZAUX et ses collaborateurs de la Station de Biologie Marine d'Arcachon. Le Professeur R. W. STRAUB, les Drs. J. GAUTRON, M. ISRAËL, B. LESBATS et R. MANARANCHE ont contribué par de fructueuses discussions à ce travail qui a bénéficié d'un subside du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (Crédits No 3.309.70 et 3.740.72).

BIBLIOGRAPHIE

- AUGER D. & FESSARD A. (1941) *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **135**, 76–78.
- BABEL-GUÉRIN E. & DUNANT Y. (1972a) *Experientia*, **28**, 726.
- BABEL-GUÉRIN E. & DUNANT Y. (1972b) *C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* **275**, 2961–2964.
- BAKER P. F., HODGKIN A. L. & RIDGWAY E. B. (1971) *J. Physiol., Lond.* **218**, 709–755.
- BLAUSTEIN M. P. (1971) *Science, N.Y.* **172**, 391–393.
- BRAY G. A. (1960) *Analyt. Biochem.* **1**, 279–285.
- DUNANT Y., GAUTRON J., ISRAËL M., LESBATS B. & MANARANCHE R. (1971) *C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* **273**, 233–236.
- DUNANT Y., GAUTRON J., ISRAËL M., LESBATS B. & MANARANCHE R. (1972) *J. Neurochem.* **19**, 1987–2002.
- DUNANT Y., GAUTRON J., ISRAËL M., LESBATS B. & MANARANCHE R. (1974) *J. Neurochem.* **23**, sous presse.
- HARVEY A. M. & MACINTOSH F. C. (1940) *J. Physiol., Lond.* **97**, 408–416.
- HODGKIN A. L. & KEYNES R. D. (1957) *J. Physiol., Lond.* **138**, 253–281.
- ISRAËL M., GAUTRON J. & LESBATS B. (1968) *C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* **266**, 273–275.
- ISRAËL M., GAUTRON J. & LESBATS B. (1970) *J. Neurochem.* **17**, 1441–1450.
- ISRAËL M. & TUČEK S. (1974) *J. Neurochem.* **22**, 487–491.
- KATZ B. (1969) *The release of Neurotransmitters Substances*, p. 33. University Press, Liverpool.
- MACINTOSH F. C. (1950) *Meth. med. Res.* **3**, 78.
- MARCHBANKS R. M. & ISRAËL M. (1971) *J. Neurochem.* **18**, 439–448.



